

EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EM RAÍZES DE *Coffea canephora* INFECTADAS COM O NEMATÓIDE ENDOPARASITA *Meloidogyne paranaensis*

Aretusa E. ANDRADE¹, Erika V. S. ALBUQUERQUE², Maria Fátima GROSSI DE SÁ², Regina M. D. G. CARNEIRO² Angela MEHTA² E-mail: amehta@cenargen.embrapa.br

¹Faculdade da Terra de Brasília, Brasília, DF ² Embrapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, Brasília, DF

Resumo:

Muitos estudos têm focado na caracterização funcional de proteínas codificadas por genes de resistência a diversos patógenos. Neste estudo, a expressão de proteínas durante a interação entre a planta de café resistente, *Coffea canephora* e o patógeno *Meloidogyne paranaensis* foi realizada. Raízes de *C. canephora* foram infectadas com inóculos do nematóide na fase de juvenis (J2) com aproximadamente 1000 larvas por planta no total de 24 plantas. As raízes foram coletadas em um intervalo de tempo de 3, 6 e 10 dias após a infecção. Raízes não infectadas foram utilizadas como controle. As raízes foram lavadas com uma solução de água e hipoclorito de sódio a 10%; congeladas e armazenadas a -80°C. O material foi utilizado para extração de proteínas, que foram submetidas a eletroforese bidimensional (2-DE). Os resultados obtidos através de 2-DE revelaram várias proteínas diferenciais nos diferentes tempos após a infecção quando os mapas foram comparados à condição controle. Na análise dos mapas de tempo 3, 5 proteínas diferenciais foram visualizadas. Enquanto que os mapas de tempo 6 e 10 revelaram 6 e 5 proteínas diferenciais, respectivamente. Essas proteínas deverão ser identificadas através de espectrometria de massa na tentativa de associá-las ao processo de resistência ao nematóide *Meloidogyne* spp, já que os mecanismos de defesa de plantas envolvem a expressão de proteínas específicas associadas ao reconhecimento do patógeno, ativando uma gama de outras proteínas responsáveis pela resistência.

Palavras chave: Eletroforese bidimensional, *Meloidogyne*, *Coffea*, expressão diferencial, interação planta-patógeno

DIFFERENTIAL EXPRESSION OF ROOT PROTEINS OF *Coffea canephora* INFECTED WITH THE NEMATODE *Meloidogyne paranaensis*

Abstract:

Recent studies have focused on the functional characterization of proteins encoded by pathogen resistance genes. In this study, we have analyzed the protein expression of coffee roots during the interaction of the resistant plant *Coffea canephora* and the pathogen *Meloidogyne paranaensis*. Roots were infected with nematodes in the J2 phase with approximately 1000 larvae per plant. The roots were obtained 3, 6 and 10 days after infection and non-infected roots were used as control. The roots were washed, stored at -80°C and then used for protein extraction and bidimensional electrophoresis (2-DE). The results obtained by 2-DE revealed several differentially expressed proteins in the infected tissues. The protein profiles obtained from the tissues 3, 6 and 10 days after infection revealed 5, 6 and 5 differential proteins, respectively. These proteins will be identified by mass spectrometry in an attempt to associate them to the resistance process, since the defense mechanisms in plants involve the expression of specific proteins associated to the recognition of the pathogen, activating other proteins responsible for resistance.

Key words: Bidimensional electrophoresis, *Meloidogyne*, *Coffea*, differential expression, plant-pathogen interaction

Introdução

Os nematóides fitopatogênicos são parasitas obrigatórios que provocam danos econômicos de bilhões de dólares à agricultura mundial. Estes assumem importância destacada na cafeicultura, onde as perdas anuais são da ordem de US\$ 2,6 bilhões.

A identificação de genes do cafeeiro envolvidos com a resistência a *Meloidogyne* spp. é de vital importância para o combate e controle deste patógeno, podendo ser utilizados em estudos futuros visando à obtenção de plantas transgênicas resistentes.

Uma das estratégias para a identificação de genes de interesse é através de estudos de expressão, incluindo a análise de proteínas expressas em determinada condição. O estudo dessas proteínas através da eletroforese bidimensional (2-DE) de proteínas e espectrometria de massa tem sido utilizada em diferentes plantas como arroz, trigo, entre outras, e várias proteínas diferencialmente expressas têm sido identificadas.

O objetivo deste trabalho foi analisar a expressão global de proteínas de *C. canephora* (genótipo resistente a *Meloidogyne* spp.) em resposta à infecção por *M. paranaensis* através de 2-DE e espectrometria de massa na tentativa de identificar proteínas/genes envolvidos com a resistência a este fitoparasita.

Material e Métodos

1. Cultura de nematóides, extração de ovos e eclosão de juvenis

M. paranaensis mantidos em tomateiros em casa de vegetação foram utilizados neste estudo. Para a obtenção dos nematóides, o sistema radicular dos tomateiros foi lavado com água corrente e as raízes foram trituradas no liquidificador com solução de 0,5% (v/v) de hipoclorito de sódio. O material resultante foi separado por um conjunto de peneiras de 100 a 400 mesh. Os ovos retidos na segunda peneira foram coletados e depois depositados em papel toalha sobre uma peneira plástica dentro de um recipiente com água destilada. Espontaneamente, os ovos eclodiram em juvenis J2, que nadaram do papel toalha para o recipiente. Os juvenis foram então coletados por centrifugação a 2500 x g por 30 minutos e contados para a infestação de plantas de café.

3. Infestação das plantas e coletas das raízes infectadas

Cada planta de café foi infectada com aproximadamente 1000 larvas de *M. paranaensis* após atingir 2 meses de idade. As coletas das raízes infectadas foram realizadas 3, 6 e 10 dias após a infecção e raízes não infectadas foram utilizadas como controle. Todas as raízes coletadas receberam o mesmo procedimento de limpeza e conservação – lavagem com água, congelamento em nitrogênio líquido e armazenamento a -80°C .

4. Extração de proteínas e eletroforese bidimensional

O material coletado foi utilizado para extração de proteínas totais de acordo com de Mot & Vanderleyden (1989). As proteínas foram posteriormente submetidas a eletroforese bidimensional para análise de proteínas diferencialmente expressas. SDS-PAGE foi realizado segundo Laemmli (1970) e os géis foram visualizados após coloração com nitrato de prata (Blum *et al.*, 1987).

Resultados e Discussão

Com a análise dos mapas obtidos, através de 2-DE, foi possível observar um total de cerca de 200 proteínas por gel, que variaram em tamanho de 10 – 200 KDa e em *pI* de 4 – 8 (Fig. 1). A comparação desses mapas nos diferentes tempos após a infecção revelou várias proteínas diferencialmente expressas, incluindo *spots* novos, maior e menor intensidade.

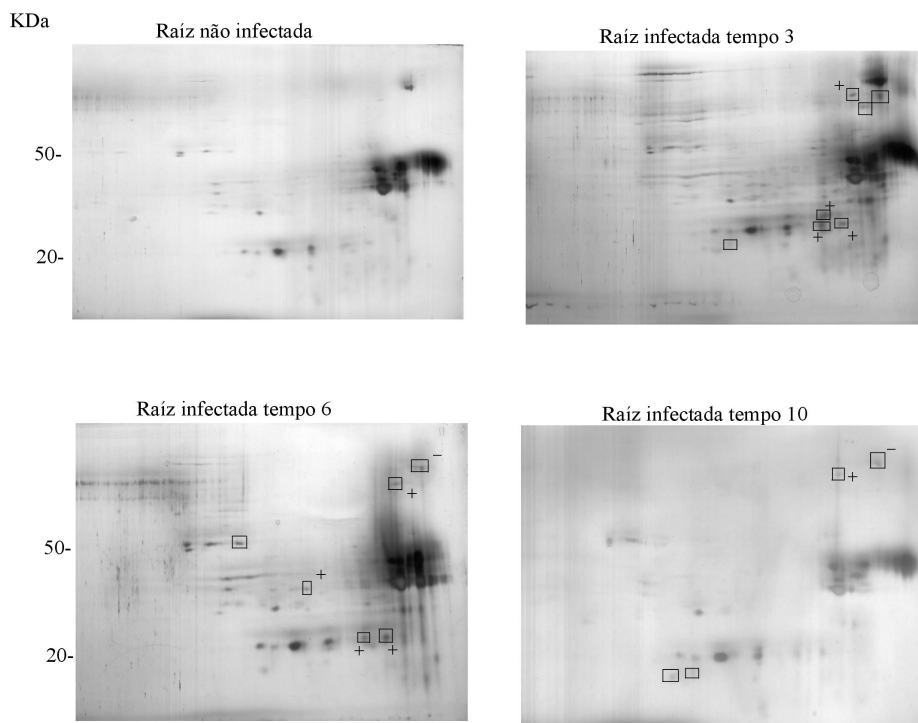


Figura 1. 2-DE de proteínas de raízes de café infectadas com *M. paranaensis* e não infectadas, conforme indicado. Os sinais + e - indicam proteínas com maior ou menor intensidade, respectivamente. Os quadrados sem símbolos indicam proteínas novas.

Na análise dos mapas de tempo 3 (3 dias após a infecção), 7 proteínas diferenciais foram visualizadas (Fig. 1). Enquanto que os demais mapas de tempos 6 e 10 revelaram 6 e 4 proteínas diferenciais, respectivamente (Fig. 1). Um mapa de proteínas de larvas J2 de *M. paranaensis* foi também construído a partir da extração de proteínas de aproximadamente 10.000 larvas (Fig. 2). As proteínas diferencialmente expressas em raízes de café não foram detectadas no mapa do nematóide, indicando que essas proteínas são de *C. canephora*. As proteínas diferenciais detectadas serão identificadas através de espectrometria de massa na tentativa de identificar proteínas/genes envolvidos com a resistência a *M. paranaensis*. Espera-se que este trabalho contribua para a melhor compreensão dos mecanismos de defesa da planta em resposta a infecção por *Meloidogyne* spp.

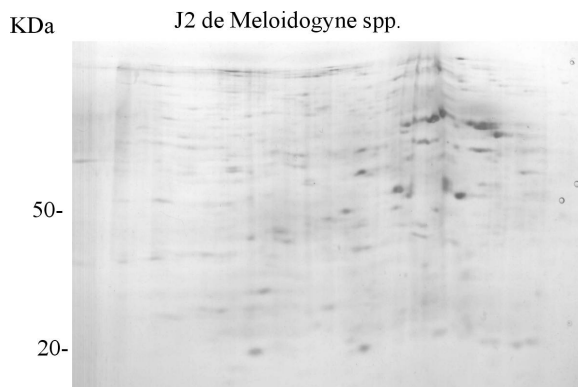


Figura 2. 2-DE de proteínas de *M. paranaensis* na fase J2.

Referências Bibliográficas

Blum, H., Beier, H., Gross, H. J. (1987) Improved silver staining of plant protein, RNA and DNA in polyacrilamide gels. *Electrophoresis*, 8:93–98.

de Mot, R, Vanderleyden, J. (1989) Application of two dimensional protein analysis for strain fingerprinting and mutant analysis of *Azospirillum* species. *Can. J. Microbiol.*, 35:960–967.

Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of the bacteriophage T4. *Nature*, 227:680–685.